

University of Groningen

3D liver models in tissue engineering and toxicology

Starokozhko, Viktoriia

IMPORTANT NOTE: You are advised to consult the publisher's version (publisher's PDF) if you wish to cite from it. Please check the document version below.

Document Version

Publisher's PDF, also known as Version of record

Publication date:

2016

[Link to publication in University of Groningen/UMCG research database](#)

Citation for published version (APA):

Starokozhko, V. (2016). *3D liver models in tissue engineering and toxicology*. [Thesis fully internal (DIV), University of Groningen]. University of Groningen.

Copyright

Other than for strictly personal use, it is not permitted to download or to forward/distribute the text or part of it without the consent of the author(s) and/or copyright holder(s), unless the work is under an open content license (like Creative Commons).

The publication may also be distributed here under the terms of Article 25fa of the Dutch Copyright Act, indicated by the "Taverne" license. More information can be found on the University of Groningen website: <https://www.rug.nl/library/open-access/self-archiving-pure/taverne-amendment>.

Take-down policy

If you believe that this document breaches copyright please contact us providing details, and we will remove access to the work immediately and investigate your claim.

Downloaded from the University of Groningen/UMCG research database (Pure): <http://www.rug.nl/research/portal>. For technical reasons the number of authors shown on this cover page is limited to 10 maximum.

Samenvatting



De vooruitgang in de ontwikkeling van 3D-levermodellen vergroot de mogelijkheden voor het bestuderen van fysiologische en pathologische processen op moleculair niveau *in vitro*, doordat de omstandigheden de *in vivo*-omgeving beter nabootsen dan conventionele 2D-levermodellen. Onderzoek heeft uitgewezen dat 3D-levermodellen gebaseerd op cel- of weefselkweek betrouwbaarder zijn en een groter voorspellend vermogen hebben voor de farmacologie en toxicologie voor mens *in vivo*, dan *in vivo*-modellen in dieren. In dit proefschrift hebben we nieuwe en bestaande 3D-levermodellen gekarakteriseerd en verbeterd voor toepassingen in de toxicologie, en voor het genereren van leverweefsel voor mogelijk toekomstig gebruik in de kliniek.

Bioartificiële lever: het verleden, heden en toekomst

De bioartificiële lever (BAL) is voorgesteld als een toekomstig alternatief voor orthotopische levertransplantatie. Een van de meest belangrijke vereisten voor een extracorporale BAL of een BAL voor transplantatie is adequate functionele capaciteit. Op dit moment lijkt het gebruik van humane geïnduceerde pluripotente stamcellen (hiPSC) als een bron voor hepatocyten de meest veelbelovende optie. In **Hoofdstuk 3** hebben we hepatische differentiatie van hiPSC uitgevoerd, en de mate van differentiatie en functionaliteit onderzocht en vergeleken met precies-gesneden plakjes humaan leverweefsel (humane *precision-cut liver slices* (hPCLS) die als beste model voor de humane lever worden gezien. De hepatische differentiatie van hiPSC is geïnduceerd op directe wijze in een 3D-bioreactor met continue doorstroming van medium, hetgeen de ontwikkeling en toekomstig gebruik van de BAL zal faciliteren, omdat het hierdoor niet meer nodig is om de gevoelige stap van het oogsten van volwassen hepatocyten en het verplaatsen naar de bioreactor uit te voeren, zoals bij klassieke 2D-differentiatiesystemen wel het geval is.

We hebben een hoge mate van hepatische differentiatie en adequaat functioneel niveau laten zien in de ontwikkelde hepatocyten, zowel in condities met permanente vloeistofstroom als onder statische condities. De activiteit van de belangrijkste enzymen die medicijnen metaboliseren in de menselijke lever waren op hetzelfde niveau (de meeste van de geteste Fase I en II-enzymen) of hoger (een van de Fase II-enzymen) vergeleken met die verkregen van hPCLS. Cellen in de BAL produceerden albumine en urea in aanzienlijke hoeveelheden, maar wel in iets lagere hoeveelheden in vergelijking met hPCLS. Galzuren werden in vergelijkbare hoeveelheden geproduceerd in vergelijking met hPCLS. We kunnen concluderen dat we goedfunctionerende hepatocyten hebben weten te genereren vanuit hiPSC,

en dat is de eerste en een van de meest belangrijke stappen in de ontwikkeling van een BAL. We verwachten dat een dergelijke BAL, na verdere ontwikkeling, in de toekomst niet alleen gebruikt kan worden in de kliniek als extracorporale leverondersteuning, maar ook voor toxicologische studies bij de ontwikkeling van medicijnen.

Een andere belangrijke eigenschap van de BAL en de focus van een literatuuronderzoek beschreven in **Hoofdstuk 2** is multicellulariteit, dat wil zeggen dat de BAL alle celtypen van de lever bevat. Tot dusver is men er nog niet in geslaagd om alle soorten levercellen in een BAL op te nemen, en geen van de beschikbare multicellulaire BALs is tot nu toe getest in de kliniek. Niet-parenchymale levercellen (NPC) zijn geen passieve inwoners van de lever, maar spelen een belangrijke rol in de uitvoer van haar functies (Malik *et al.*, 2002). Ook is aangetoond dat co-cultures van hepatocyten met NPC beter de leverfuncties kunnen uitvoeren (Cohen *et al.*, 2015): niet alleen hielpen de NPC om hepatocytdifferentiatie te ondersteunen, maar verbeterden ook hun functie *in vitro*.

De architectuur van de lever is uniek en cruciaal om haar functies te vervullen. Daarom zouden zouden cellen in een multicellulaire BAL bij voorkeur zo gepositioneerd moeten zijn dat zij de architectuur van de lever nabootsen, inclusief het vormen van vasculaire structuren en netwerken van galgangen, in plaats van willekeurig georganiseerd te zijn. Alhoewel vele technieken zijn gebruikt om de complexe structuur van de lever *in vitro* na te bouwen, zoals beschreven in **Hoofdstuk 2**, zijn zij tot nu toe alleen nog maar ingezet op microschaal. Voor de productie van een BAL die bestaat uit miljarden cellen, moeten de protocollen worden opgeschaald en geoptimaliseerd. Ook is het apart opvangen van gal en eliminering uit de BAL nog steeds een uitdaging, waar nog geen oplossing voor is gevonden.

Optimalisatie van het PCLS-model

Bestaande humane *in vitro*-modellen zijn niet altijd representatief voor de humane *in vivo*-situatie, door het gebrek aan functionaliteit of complexiteit. Alhoewel de verwachting is dat het gebruik van menselijke cellen of weefsel een beter model geeft voor het voorspellen van toxiciteit in mensen vergeleken met diermodellen, zorgt de beperkte beschikbaarheid van menselijk weefselmateriaal ervoor dat het gebruik van *in vitro*- en *in vivo*-diermodellen nog steeds nodig is. PCLS zijn een gevalideerd model voor vele toxicologische en farmacologische studies (de Graaf *et al.*, 2007, Elferink *et al.*, 2008). Ze bevatten alle verschillende leverceltypen in hun natuurlijke omgeving met intacte cel-celinteracties en cel-matrixcontact. De belangrijkste limitatie van PCLS is hun beperkte levensvatbaarheid *in vitro*,

en afname van activiteit van metabole enzymen (voornamelijk fase 1), al na 24 uur (Catania *et al.*, 2003, de Graaf *et al.*, 2010, Lerche-Langrand and Toutain, 2000). Daarom is gebruik van dit model tot nu toe beperkt gebleven tot studies naar acute toxiciteit. In dit proefschrift hebben we de mogelijkheden voor het gebruik van PCLS uitgebreid door de levensvatbaarheid en functionaliteit te verlengen tot 5 dagen door gebruik te maken van verrijkt kweekmedium.

In **Hoofdstuk 4** en **5** hebben we laten zien dat PCLS levensvatbaar kunnen blijven tot 5 dagen en dat de samenstelling van het medium van cruciaal belang is voor behoud van leverspecifieke functies en morfologische integriteit. Ook hebben we de effecten van de verschillende media op het gedrag van de weefselplakjes van mens en rat bestudeerd en vergeleken. In **Hoofdstuk 4** hebben we laten zien dat NPC levensvatbaar en functioneel blijven in rat-PCLS na 5 dagen incubatie, wat een belangrijke mijlpaal is aangezien aangetoond is dat NPC direct betrokken zijn bij de toxiciteit of farmacologische effecten van verscheidene stoffen (Westra *et al.*, 2014, Hadi *et al.*, 2013). We vonden een substantiële mate van fibrose in rat-PCLS na 5 dagen incubatie, terwijl het in menselijke PCLS minder uitgesproken was, zoals aangetoond in **Hoofdstuk 5**. Interessant is dat na 5 dagen incubatie er een nieuwe cellijn was gevormd rondom de rat-PCLS, wat in acht genomen moet worden bij het opzetten en interpreteren van kinetische experimenten, aangezien de capsule mogelijk kan interfereren met de opname van stoffen uit het medium, en de excretie uit het weefselplakje.

In **Hoofdstuk 5** hebben we voor het eerst laten zien dat menselijke PCLS functioneel kunnen blijven voor langere tijd. De activiteit en expressie van Fase I- en Fase II-metabolisme, net als transporters die betrokken zijn bij het transporteren van medicijnen, daalde niet gedurende een periode van vijf dagen incubatie in Cellartis®-medium. Dit is een belangrijke verbetering van de PCLS-technologie, en maakt het een uitstekend model voor toxiciteit- en metabolismestudies voor de mens. Ook de productie van glycogeen (rat en humaan) en albumine (humaan) was beter gepreserveerd in PCLS geïncubeerd in verrijkt medium vergeleken met het standaard kweekmedium Williams Medium E (WME). Transcriptomics-analyse op humane PCLS toonde aan dat de veranderingen in de expressie van genen zeer beperkt was en dat slechts twee routes voor levertoxiciteit significant gereguleerd zijn na vijf dagen incubatie: leverfibrose en oxidatieve stress. Ook hier zagen we dat de humane PCLS na 3-5 dagen van incubatie zijn omgeven door een nieuwe cellaag.

Toepassing van het PCLS-model voor het bestuderen van geneesmiddel-geïnduceerde cholestase

Eerder is al aangetoond door ons en anderen dat muizen- en humane PCLS bruikbaar zijn voor de voorspelling van veranderingen in genexpressie die zijn geassocieerd met cholestatische schade (Szalowska *et al.*, 2013, Vatakuti *et al.*, 2016). Directe veranderingen in de intracellulaire galzuurpool zijn echter tot nu toe nog niet bestudeerd in experimentele *in vitro*-omstandigheden. Zoals we hebben laten zien in **Hoofdstuk 6** is de toevoeging van een fysiologisch mengsel van galzuren (GZ) aan het incubatiemedium cruciaal om een fysiologische balans te behouden van GZ in PCLS gedurende de incubatie, en om intracellulaire accumulatie van GZ te detecteren. We hebben niet alleen gedemonstreerd dat het mogelijk is om de toename in totale GZ na blootstelling aan bepaalde geneesmiddelen *ex vivo* na te bootsen, maar ook dat we in staat zijn om de verschuiving in de verhouding van de hoeveelheden van de individuele GZ te detecteren. We hebben bijvoorbeeld laten zien dat de concentratie en verhouding van de lipofiele en toxische GZ, zoals DCA en CDCA en hun conjugaten, ten opzichte van de hydrofiele galzouten toenemen in PCLS die behandeld zijn met bekende cholestatische medicijnen zoals chlorpromazine, glibenclamide of cyclosporine A. Onze data geven de suggestie dat niet de concentratietoename in totale GZ verantwoordelijk is voor de geobserveerde toxiciteit, maar dat het aannemelijker is dat dit wordt veroorzaakt door een of meerdere specifieke GZ, zoals CDCA, DCA of hun conjugaten, aangezien we geen toxiciteitslimiet vonden voor de totale GZ-concentratie. Ook de kleine afname in levensvatbaarheid van PCLS behandeld met deze cholestatische geneesmiddelen in afwezigheid van toegevoegde GZ en de gelijktijdige opregulatie van toxische routes die geassocieerd zijn met inflammatie en oxidatieve stress zoals door anderen geobserveerd (Szalowska *et al.*, 2013), doen vermoeden dat naast GZ-gemedieerde toxiciteit, deze geneesmiddelen meerdere pathologische veranderingen induceren die de mate van schade bepalen.

Afsluitende opmerkingen

De resultaten in dit proefschrift laten een zeer goed potentieel zien voor het gebruik van *in vitro*-3D-levermodellen voor weefselregeneratie voor toepassing in de kliniek en in de toxicologie. Het gebruik van humane *ex vivo*- en *in vitro*-levermodellen dragen bij aan de beginselen van de 3V's (Vermindering, Vervanging en Verfijning van proefdiergebruik) en

kan een uitstekende bijdrage leveren aan het vervangen van dierstudies tijdens het ontwikkelingsproces van medicijnen in de nabije toekomst.

References

- Catania JM, Parrish AR, Kirkpatrick DS, Chitkara M, Bowden GT, Henderson CJ, Wolf CR, Clark AJ, Brendel K, Fisher RL, Gandolfi AJ. 2003, Precision-cut tissue slices from transgenic mice as an in vitro toxicology system, *Toxicology in Vitro*, 17: 201-5.
- Cohen M, Levy G, Nahmias Y. 2015, 'Coculture and Long-Term Maintenance of Hepatocytes' in eds. Vinken M, Rogiers V, Springer New York; 161-173.
- de Graaf IAM, Groothuis GMM, Olinga P. 2007, Precision-cut tissue slices as a tool to predict metabolism of novel drugs, *Expert Opin Drug Metab Toxicol*, 3: 879-98.
- de Graaf I.A.M., Olinga P, de Jager M.H., Merema MT, de Kanter R, van de Kerkhof E.G., Groothuis GMM. 2010, Preparation and incubation of precision-cut liver and intestinal slices for application in drug metabolism and toxicity studies, *Nat Protocols*, 5: 1540-51.
- Elferink MGL, Olinga P, Draaisma AL, Merema MT, Bauerschmidt S, Polman J, Schoonen WG, Groothuis GMM. 2008, Microarray analysis in rat liver slices correctly predicts in vivo hepatotoxicity, *Toxicol Appl Pharmacol*, 229: 300-9.
- Hadi M, Westra IM, Starokozhko V, Dragovic S, Merema MT, Groothuis GM. 2013, Human precision-cut liver slices as an ex vivo model to study idiosyncratic drug-induced liver injury. *Chem Res Toxicol*, 26: 710-20.
- Lerche-Langrand C, Toutain HJ. 2000, Precision-cut liver slices: characteristics and use for in vitro pharmaco-toxicology, *Toxicology*, 153: 221-53.
- Malik R, Selden C, Hodgson H. 2002, The role of non-parenchymal cells in liver growth, *Semin Cell Dev Biol*, 13: 425-31.
- Szalowska E, Stoopan G, Groot MJ, Hendriksen PJM, Peijnenburg AACM. 2013, Treatment of mouse liver slices with cholestatic hepatotoxicants results in down-regulation of Fxr and its target genes, *BMC Medical Genomics*, 6: doi: 10.1186/1755-8794-6-39.
- Vatakuti S, Olinga P, Pennings JLA, Groothuis GMM. 2016, Validation of precision-cut liver slices to study drug-induced cholestasis: a transcriptomics approach, *Arch Toxicol*, : 1-12.
- Westra IM, Oosterhuis D, Groothuis GMM, Olinga P. 2014, The Effect of Antifibrotic Drugs in Rat Precision-Cut Fibrotic Liver Slices. *PLoS ONE*, 9: e95462.